

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410066777.4

[51] Int. Cl.  
G01N 33/543 (2006.01)  
G01N 33/532 (2006.01)

[43] 公开日 2006年4月5日

[11] 公开号 CN 1755364A

[22] 申请日 2004.9.29

[21] 申请号 200410066777.4

[71] 申请人 上海生物芯片有限公司

地址 201203 上海市浦东新区张江高科技园区李冰路 151 号

[72] 发明人 张庆华 吴 船 王升年 奚佳捷

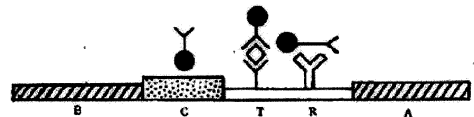
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

## [54] 发明名称

免疫胶体金检测出血性大肠杆菌 O157

## [57] 摘要

本发明“免疫胶体金检测出血性大肠杆菌 O157”涉及生物医学领域，是运用一种免疫胶体金标记检测出血性大肠杆菌 O157 的方法。本试剂盒是以：“测流式免疫色谱试验”形式，利用抗原抗体夹心法设计制成的。该发明的技术方案是将待测目的 O157 的抗体标记胶体金，然后以此标记了的抗体结合待测一样本中的目的抗原 O157，最终被固定在膜上检测区的相应的另一个抗体捕获，形成一肉眼可见的检测带，可见检测带为样本中有目的细菌，检测带上积聚的胶体金能为肉眼所见。本发明将免疫胶体金技术运用到大肠杆菌 O157 快速检测试剂盒中，在医学及进出口食品卫生等检验中既能进行定性检测同时又能节省时间，节约了成本。



1. 一种免疫胶体金标记，检测出血性大肠杆菌 O157 技术，其特征在于，将待测目的的 O157 的抗体标记胶体金，然后以此标记了的抗体去结合待测样本中的目的抗原——出血性大肠杆菌 O157，最终被固定在膜上检测区的相应抗体捕获，形成一检测带。
2. 根据权利要求 1 所述的免疫胶体金标记技术，其特征在于，所形成的检测带是一可见的检测带，可见检测带为样本中有目的细菌使检测带上积聚的胶体金能为肉眼所见。
3. 根据权利要求 1 所述的免疫胶体金标记技术，其特征在于，所述胶体金的制备是取四氯化金以柠檬酸三钠还原它成为胶体金。
4. 根据权利要求 1 所述的免疫胶体金标记技术，其特征在于，所述的胶体金标记和固相化是将胶体金以百德仪的气压喷头喷到玻璃纤维素上。成为一胶体金垫，冷冻干燥待用。
5. 根据权利要求 1 所述的免疫胶体金标记技术，其特征在于，分别将检测目的蛋白相应得另一个抗体以百德仪的喷头喷到硝酸纤维素膜上形成检测带，同时将二抗也喷到硝酸纤维素膜上，形成对照线，以中性蛋白封闭，干燥。
6. 根据权利要求 1 所述提供了一种通用胶体金试剂盒组件，包括底板，上端吸水纸，喷有抗体的膜，胶体金垫，下端吸水纸。
7. 根据权利要求 6 所述试剂盒组件中下端为加样区，操作时将增菌液加入加样孔中，然后观察结果。
8. 根据权利要求 6 所述试剂盒组件中上端为反应区，反应时观察结果，出现两条反应带时说明反应呈阳性；出现一条反应带时反应为阴性；无反应条带出现时说明反应无效。

## 免疫胶体金检测出血性大肠杆菌 O157

### 技术领域

本发明涉及生物医学领域，特别涉及一种在医学检验以及进出口食品卫生检验中应用的免疫胶体金标记技术及快速检测试剂盒。

### 背景技术

近年来，国际国内食品安全恶性事件不断发生，造成了十分巨大的经济损失。如英国仅禁止牛肉进口一项，每年就损失 52 亿美元。同时我国国内的食源性疾病也同样非常突出，每年卫生部都会接到食物中毒报告 100—200 起，涉及数千人发病，百余人死亡，除意外事故外，大部分均是致病微生物引起的。

肠出血性大肠杆菌 O157:H7（以下简称 O157:H7）是新近认识的一种人类出血性结肠炎和溶血性尿毒综合征的肠道致病菌。1982 年美国首次报告了由该菌引起的出血性结肠炎。另外，澳大利亚、欧洲、非洲的某些国家也有发生。1996 年夏季由此菌造成的食物中毒使日本近万人感染。因此，引起世界各国普遍关注。我国 1988 年由权太淑报道从江苏腹泻患者分离 5 株 O157:H7。虽未发现感染暴发，但并不意味着没有发生过，因国内不断有所谓原因不明的食物中毒发生，由于受条件所限没能做进一步的鉴定。因而不能排除发生过 O157:H7 感染暴发的可能性。通常此菌存于牛等家畜肠道内，污染食品可引起食物中毒和感染性腹泻等疾病的散发和暴发流行。

随着世界科学技术日新月异的发展和人类物质生活的不断改善，人们普遍提高了对食品安全卫生质量的意识和要求，为此世界各国政府也相应加强了对有关食品安全卫生控制的关注，并制定了许多有关食品安全的强制性法律法规，以减少和杜绝在食品加工过程中可能存在或出现的危害因素；保证食品进入流通领域或到达消费者手中时，能将危害健康的风险降低至最小程度。在食品生产企业中推行 HACCP（危害分析和关键控制点）正是基于这一原则。

在现有技术中，病原菌的检测主要是利用微生物学方法、生物化学方法、血清学方法和 PCR 方法。这些方法都有着这样或那样的一些限制：1) 由于需要培养，所需时间长；2) 不能区别相近的致病菌；3) 不能鉴定未知的致病菌；4) 交叉反应和其他假阳性；5) 灵敏度较差。

无论是传统的细菌检测技术，还是 PCR 检测技术，都需要一定的仪器设备和相关的技术支持才能进行。对于现在国内国外对食品安全要求的不断提高，以及基层普及的现状，这些检测方法有时就比较局限，无法做到即时即地。尽管目前国内外已有不少针对致病微生物的快速检测方法。其中包括一些自动的仪器和免疫试剂盒及利用分子生物学方法如核酸扩增技术、基因探针等，但上述这些方法有些属于初步筛选，有些又必需配置比较昂贵的设备。这对不少基层单位来说目前尚难以承受。为此，需要开发一种快速简便，易学易用的检测技术。

免疫胶体金技术作为一种新的免疫学方法，其发展十分迅速，在生物医学各研领域，特别是在医学检验中得到日益广泛的应用。胶体金已成为继荧光素，放射同位素和酶之后，在免疫标记技术中较为常用的一种非放射性标记。

胶体金是由于氯金酸在还原剂如鞣酸，柠檬酸三钠的作用下聚合形成特定大小的金颗粒，并由于静电作用形成一种稳定的胶体状态，它具有高电子密度，能与多种生物大分子结合的特点，免疫金标记技术主要利用了金颗粒的这一特征，在金标蛋白结合处于显微镜下可见

黑褐色颗粒，当这些标物在相应的配体处大量聚集时，肉眼可见红色或紫红色斑点，因而用于定性或半定量的快速免疫检测方法中

由于胶体金检测试剂盒与放免，酶标试剂盒相比，具有操作使用安全（无放免物的污染），简便（简单操作一步完成），适用于单人份检测（放免和酶标试剂盒不适于单人份或少量样品检测）和快速（10分钟左右即可有结果）等优点，因此近几年来金标诊断试剂盒正日益流行，在某些项目上与已逐渐替代了放免、酶标试剂盒，如早早孕试剂条（HCG Test Strip）等。

#### 发明内容

本发明是建立一种简易快速、自测式胶体金免疫层析法(GICA)用于检测食品中所含的致病菌，目前以大肠杆菌 O157 为主要检测对象。其主要工作原理是将一种高特异性高效价的抗 O157 抗体与胶体金颗粒交联并以硝酸纤维素膜作为载体。在同一纤维膜上分为两个区域段，A 区是包被有抗体与胶体金颗粒交联物的条带，B 区是放置已知阳性复合物的对照条带，并将上述纤维膜放置于一双层塑料模板中，在模板上方表面有一圆形加样孔，及一长方形的视窗。当操作者将检样的增菌液加入到模板加样孔中，培养液即可通过在纤维膜上的渗透，逐渐向前延伸，当增菌液向前延伸到测试(A)区时如其中有 O157 存在，则即被包被在此的抗体捕获，并形成夹心法复合物并呈现红色反应条带即可判为阳性反应；然后抵达已知对照(B)区。被检样品增菌液中不论是否含有 O157 在通过对照区时，由于受潮即起反应，会出现一条红色条带，如增菌液中不存在 O157，则在此区域也无复合物形成。因此无条带呈现。对此结果应判为阴性反应。

主要技术：本试剂盒是以“测流式免疫色谱”形式设计制成的。其主要工作原理是将一种高特异性高效价的抗 O157 抗体与胶体金颗粒交联并以硝酸纤维素膜作为载体。免疫金标记技术主要利用了金颗粒具有高电子密度的特性，在金标蛋白结合处，在显微镜下可见黑褐色颗粒，当这些标记物在相应的配体处大量聚集时，肉眼可见红色或粉红色斑点，因而用于定性或半定量的快速免疫检测方法中，这一反应也可以通过银颗粒的沉积被放大，称之为免疫金银染色。

本发明的目的之一是提供了一种通用胶体金试剂盒组件，包括底板，上端吸水纸，喷有抗体的膜，胶体金垫，下端吸水纸。本发明的目的之二是提供一对针对大肠杆菌 O157 的不同抗原位点的特异性抗体，其中一个抗体被标记胶体金。

本发明的技术方案如下：一种免疫胶体金标记技术，将待测目的 O157 的抗体标记胶体金，然后以此标记了的抗体结合待测一样本中的目的抗原 O157，最终被固定在膜上检测区的相应的另一个抗体捕获，形成一肉眼可见的检测带，可见检测带为样本中有目的细菌，检测带上积聚的胶体金能为肉眼所见。

所述胶体金的制备是取四氯化金以柠檬酸三钠还原它成为胶体金。

所述抗体的胶体金标记和固相化是将胶体金标记到抗体上，再以百德仪的气压喷头喷到玻璃纤维素膜上。成为一胶体金垫，于 37℃ 干燥待用。

分别将检测目的蛋白相应得另一个抗体以百德仪的喷头喷到硝酸纤维素膜上形成检测带，同时将二抗也喷到硝酸纤维素膜上，形成对照线，以中性蛋白封闭，干燥。

上述检测应在加样后 15 分钟内观察结果，如果超过 20 分钟由于会造成显色过度而形成误判。

本发明使用免疫胶体金标记技术建立诊断试剂盒，既能进行定性检测同时又能做到快速准确。运用本发明技术建立的试剂盒与同类试剂盒相比，操作简单方便，省时省力，节约成

本，在检测灵敏度要求较低的样本时，可根据试条有无显色筛去阴性结果。该项目与现有技术相比，可快速准确的检测食品中的致病微生物 O157。另外，它的主要优点还有方便快捷，同时又无需任何特殊的辅助仪器设备。自己开发的成本相对与国外同类产品要低三分之二左右，因此有着广泛的应用基础和市场潜力。

#### 附图说明

图 1 免疫胶体金检测出血性大肠杆菌 O157 结果图

图 2 免疫层析试验原理示意图

参照图 1、图 2，此免疫层析试验主要运用单克隆双抗体夹心法。试验所用试剂全部为干试剂，多个试剂被组合在一个约 6mm×70mm 的塑料板条上，成为一单一试剂条，试剂条上端（A）和下端（B）分别粘贴吸水材料，免疫金复合物干片粘贴在近下端（C）处，紧贴其上为硝酸纤维素膜条。硝酸纤维素膜条上有两个反应区域，测试区（T）包被有特异性 O157 抗体，参照区（R）包被有抗小鼠 IgG 抗体。

测定时将液体标本滴入试纸条下端加样孔中，下端吸水材料即吸取液体向上端移动，流经 C 处时使干片上的免疫金复合物复溶，并带动其向膜条渗移。若标本中有待测沙门氏菌，其时可与免疫金复合物之抗体结合，此抗原抗体复合物流至测试区即被固相单克隆抗体所获，在膜上显出红色反应线条—检测线（T）。过剩的免疫金复合物继续前行，至参照区与固相抗小鼠 IgG 抗体结合（免疫金复合物中的单克隆抗体为小鼠 IgG），而显出红色质控线条—对照线（R）。反之，阴性标本则无反应线条，而仅显示质控线条。

#### 具体实施方式：

##### 1、配对抗体的选择：

配对抗体的选择是选用目前市场上已有的商品化抗体，将所有相关抗体作配对实验后，找到亲和性和亲合力最佳的一对抗体。

我们选取了大约有 50 个相关抗体，经过反复实验，主要是运用夹心法进行实验，最后选定了一对效果最佳的抗体。实验结果证明，该方案实施可避免样品检测中假阴性信号的出现，并且获得结果最为稳定。

##### 2、胶体金的制备：

胶体金的制备是取四氯化金以柠檬酸三钠还原它成为胶体金。

##### 3、抗体的金标以及固相化：

抗体的胶体金标记和固相化是将胶体金标记到抗体上，再以百德仪的气压喷头喷到玻璃纤维素膜上，成为一胶体金垫，冷冻干燥待用。

抗体或二抗包被到硝酸纤维素膜上及其封闭

##### 4、抗体或二抗包被到硝酸纤维素膜上及其封闭

分别将检测目的蛋白相应的另一个抗体以百德仪的喷头，喷到硝酸纤维素膜上形成检测带即 T 带，同时将抗鼠 IgG 二抗也喷到硝酸纤维素膜上，形成对照线，以中性蛋白封闭，干燥。

##### 5、试剂盒的组装

试剂盒的组装是将各成分（底板，上端吸水纸，喷有抗体的膜，胶体金垫，下端吸水纸）组装，裁剪，包装。

##### 6、待检样品的处理

食物标本，将 25g 标本磨碎，立即接种于 225ml 的 mEC 肉汤，31 度恒温摇床培养 9h，

---

建议使用增菌液为添加 20mg/L 新生霉素的 EC 改良肉汤。

7、检测方法包括以下步骤：

用加样器取前增菌液样品 150ul，加入检测卡一端的加样孔；5—15 分钟内观察结果。

8、解释结果：

增菌后出现阴性结果，可判断为阴性。

增菌液出现阳性结果，可进行病原菌鉴定。

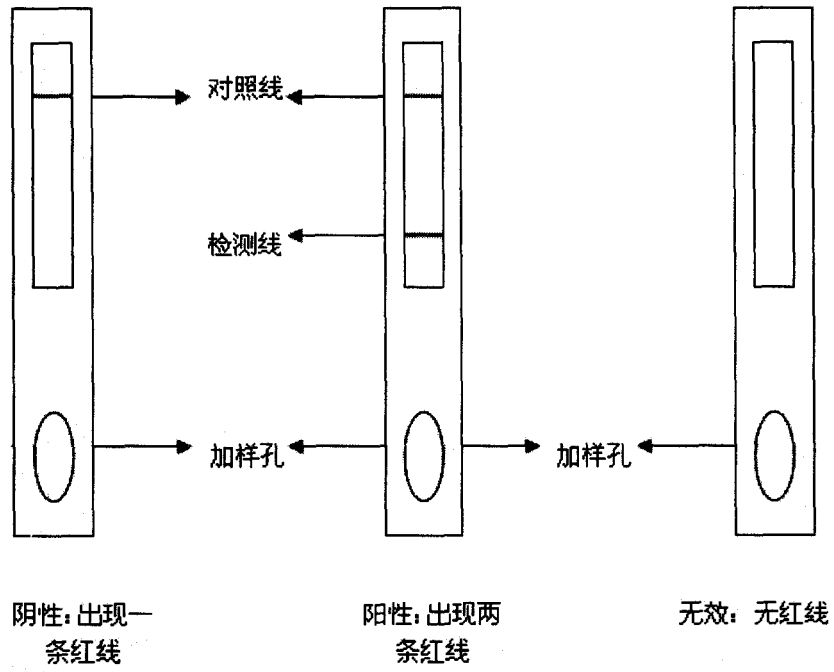


图 1 免疫胶体金检测出血性大肠杆菌 O157 结果图

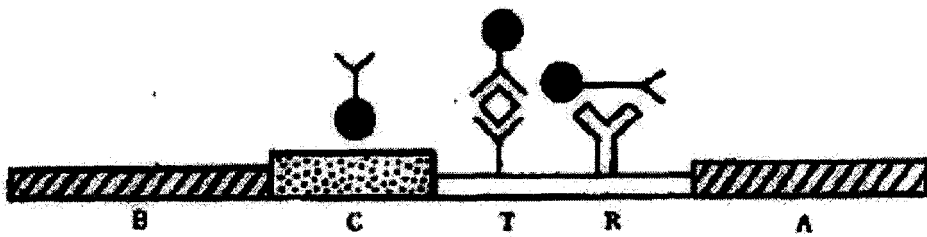


图 2 免疫层析试验原理示意图

专利名称(译)	免疫胶体金检测出血性大肠杆菌O157		
公开(公告)号	<a href="#">CN1755364A</a>	公开(公告)日	2006-04-05
申请号	CN200410066777.4	申请日	2004-09-29
[标]申请(专利权)人(译)	上海生物芯片有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海生物芯片有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海生物芯片有限公司		
[标]发明人	张庆华 吴船		
发明人	张庆华 吴船 王升年 奚佳捷		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/532		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明“免疫胶体金检测出血性大肠杆菌O157”涉及生物医学领域，是运用一种免疫胶体金标记检测出血性大肠杆菌O157的方法。本试剂盒是以：“测流式免疫色谱试验”形式，利用抗原抗体夹心法设计制成的。该发明的技术方案是将待测目的O157的抗体标记胶体金，然后以此标记了的抗体结合待测一样本中的目的抗原O157，最终被固定在膜上检测区的相应的另一个抗体捕获，形成一肉眼可见的检测带，可见检测带为样本中有目的细菌，检测带上积聚的胶体金能为肉眼所见。本发明将免疫胶体金技术运用到大肠杆菌O157快速检测试剂盒中，在医学及进出口食品卫生等检验中既能进行定性检测同时又能节省时间，节约了成本。

